

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年10 月13 日 (13.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/094572 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A01K 67/027, C07K 16/18, C12N 15/09
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006298
- (22) 国際出願日: 2005 年3 月31 日 (31.03.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-107669 2004 年3 月31 日 (31.03.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5 丁目5 番1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 児玉 龍彦 (KO-DAMA, Tatsuhiko) [JP/JP]; 〒1540002 東京都世田谷区下馬4 丁目1 6 番5 号 Tokyo (JP). 山田 良樹 (YAMADA, Yoshiki) [JP/JP]; 〒4120038 静岡県御殿場市駒門1 丁目1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 鎌田 宣夫 (KAMADA, Nobuo) [JP/JP]; 〒4120038 静岡県御殿場市駒門1 丁目1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 寺社下 浩一 (JISHAGE, Kou-ichi) [JP/JP]; 〒4120038 静岡県御殿場市駒門1 丁目1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NONHUMAN ANIMAL FOR CONSTRUCTING ANTIBODY AND METHOD AND SYSTEM OF CONSTRUCTING ANTIBODY USING THE SAME

(54) 発明の名称: 抗体作製用非ヒト動物およびこれを用いた抗体作製方法およびシステム

(57) Abstract: A transgenic animal is constructed by converting a membrane protein serving as a background antigen into the soluble type and using a gene encoding the same. In this transgenic animal, no antibody against the membrane protein serving as the background antigen contained in an immunogen is observed and immune tolerance to the full-length membrane protein can be induced even by using the gene encoding the soluble type protein. By expressing the membrane protein serving as the background protein as the soluble type protein in the transgenic animal body, moreover, the appearance of an undesirable phenotype can be avoided in the case of expressing the full-length membrane protein, which makes the transgenic animal usable over a wide range as an immune animal.

(57) 要約: 背景抗原である膜蛋白質を可溶型とし、これをコードする遺伝子を用いてトランスジェニック動物を作製した。このトランスジェニック動物では、免疫原中に含まれる背景抗原の膜蛋白質に対する抗体が見られず、可溶型蛋白質をコードする遺伝子を用いても全長の膜蛋白質に対する免疫寛容が誘導することができた。その上、トランスジェニック動物の生体内で背景抗原の膜蛋白質を可溶型蛋白質として発現させることにより、膜蛋白質全長を発現させた場合の好ましくない表現型の出現を回避することができ、広く免疫動物として利用可能にすることができた。

WO 2005/094572 A1

明 細 書

抗体作製用非ヒト動物およびこれを用いた抗体作製方法およびシステム
技術分野

[0001] 本発明は、標的抗原以外に背景抗原を含む免疫原で動物を免疫して標的抗原に対する特異抗体を作製する抗体作製システム等に関し、特に免疫動物に膜蛋白質からなる背景抗原に対する免疫寛容を誘導するために、免疫動物に膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードする遺伝子を保持させたシステム等に関する。

背景技術

[0002] 抗体の作製に必要な標的抗原の発現、精製が困難な場合、抗体は作製することが極めて困難である。膜タンパクではこの傾向が顕著である。そこで、抗原タンパクをバキュロウイルスに属するAutographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV)の膜表面に発現させる事により、7回膜貫通タンパクなど発現や精製が困難なタンパクを抗原として利用する手法が開発されている(非特許文献1)。

[0003] しかしながら、バキュロウイルス発現系は膜タンパク質を含め種々のタンパク質の発現系として有用であるが、バキュロウイルスの表面には膜タンパク質gp64(非特許文献2、3)が多数存在し、これがバキュロウイルス発現系による発現産物に混在する。gp64は分子量64 kDaの出芽ウイルス表面の主要な構成成分であり、低pHにおけるエンベロープの融合に関与するタンパクである事が知られている。このgp64は、ヒト由来抗原タンパクと比較し非自己として認識され易く、免疫原中にgp64が混在すると、標的抗原よりもgp64に対する抗体が産生され易い。そのため、バキュロウイルス発現系を用いて免疫原を調製した場合、抗原タンパクに対する特異抗体の産生・取得は困難である(非特許文献4)。この問題を解決する手段として、本願発明者らによりgp64トランスジェニックマウス(以下、「Tgm」という)が創出された。このTgm(以下、「gp64Tgm」という)は、免疫系が発達する以前から内在性遺伝子と同様に外来性のgp64を保持している。そのため、このTgmは、内因性遺伝子と同様にgp64に対し免疫寛容を示し、バキュロウイルスで発現させた標的抗原タンパクを認識し有利に特異抗体を産生させることが可能となる(特許文献1)。

[0004] しかしながら、gp64Tgmは精巣が発達せず、精子が形成されないという表現型を示すものだった。したがって、系統の維持は雌に限定され、系統の維持はできるものの効率的な繁殖ができなく、また、他の遺伝子欠損マウスあるいはTgmとの交配による交雑種を作製する際にも、利用しにくい面があった。

特許文献1:WO 03/104453

非特許文献1:Biotechnology , vol.13, 1079-84 1995.

非特許文献2:Journal of Immunological Methods, vol.234, 123-135 2000

非特許文献3:Journal of Virology, vol.70, No.7, 4607-4616 1996

非特許文献4:Journal of Virology, vol.69, No.4, 2583-2595 1995

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] 上述したとおり、上記gp64Tgmはバキュロウイルスを用いて発現させた蛋白質に対する特異的な抗体を産生させるための免疫動物として有益であるが、不妊という問題があった。そこで、このような外来の膜蛋白質をトランスジェニック動物で発現・維持することを可能にするために、精巣の発達抑制等のような好ましくない表現型を持たない一層有益なTgmの創出、及びこの新規なTgmを用いた抗体作製方法等を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本願発明者らは、精巣発達抑制の原因が精巣内の細胞膜上へのgp64の発現によると予想した。そこで、gp64(全長)の膜貫通領域を削除した可溶型gp64(以下、「sgp64」という)をpCAGGSベクター(Gene, vol.108, 193-200 1991)につなぎsgp64発現ベクター(以下、「pCAG-sgp64ベクター」という)を構築した。これをマウスに導入して、sgp64Tgmを作製したところ、雄Tgmも繁殖能を保持し、従来の精巣の発達抑制という問題を解消することに成功した。さらに、これらsgp64Tgmおよびコントロールの非トランスジェニックマウスを出芽バキュロウイルスで免疫し、血清を採取し、gp64に対する免疫寛容の有無を調べた。その結果、コントロールの非トランスジェニックマウスでは、gp64に対する抗体が産生されていたが、sgp64Tgmではgp64に対する抗体はほとんど検出されなかった。すなわち、本願発明者らは、sgp64を用いることにより従来の

gp64Tgmで見られた雄の不妊を回避でき、バキュロウイルスに発現させた抗原を用いた抗体作製にとって有効なトランスジェニックマウスを確立することができた。本願発明は、これら知見に基づくものであり、具体的には以下の通りである。

- [0007] [1] 膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物。
- [2] 可溶型蛋白質をコードした遺伝子が外来から導入されたトランスジェニック動物からなる、[1]記載の非ヒト動物。
- [3] 可溶型蛋白質をコードした遺伝子が外来から導入されたトランスジェニック動物の子孫である、[2]記載の非ヒト動物。
- [4] 膜蛋白質がウイルス由来である、[1]～[3]のいずれかに記載の非ヒト動物。
- [5] ウイルスがバキュロウイルスである、[4]に記載の非ヒト動物。
- [6] 膜蛋白質がgp64である、[5]記載の非ヒト動物。
- [7] 可溶型蛋白質が膜貫通領域を欠損したgp64である、[6]記載の非ヒト動物。
- [8] 可溶型蛋白質がgp64の細胞外領域からなる、[6]記載の非ヒト動物。
- [9] 非ヒト動物がマウスである、[1]～[8]のいずれかに記載の非ヒト動物。
- [10] 雄が繁殖能を有する、[6]～[9]のいずれかに記載の非ヒト動物。
- [11] [1]～[10]のいずれかに記載の非ヒト動物を、標的抗原を含有する免疫原で免疫する工程、
- 前記標的抗原に対する抗体または抗体をコードした遺伝子を取得する工程を含む、抗体作製方法。
- [12] 免疫原がウイルス粒子またはその一部である、[11]記載の抗体作製方法。
- [13] ウイルスがバキュロウイルスである、[12]記載の抗体作製方法。
- [14] 標的抗原が膜蛋白質である、[11]～[13]のいずれかに記載の抗体作製方法。
- [15] [1]～[10]記載の非ヒト動物を含む抗体作製システム。

- [0008] 上記本発明の理解を容易にするために、前提となるいくつかの用語の意味を説明する。

本発明において、「標的抗原」とは、目的とする抗体が認識する抗原を言う。標的抗原は、抗原性を有する任意の物質から選択することができる。具体的には、蛋白質、

糖鎖、脂質、あるいは無機物質などが抗原性を示す物質として知られている。標的抗原は、天然に存在するものであることもできるし、人工的に合成されたものであっても良い。人工的に合成されたものには、遺伝子工学技術を利用して作製された組み換え蛋白質や、化学的に合成された様々な有機物質が含まれる。

[0009] 「背景抗原(back ground antigens)」とは、抗体の産生を希望しない抗原決定基を有する物質、またはその抗原決定基そのものを言う。たとえば、標的抗原に混在する標的抗原以外の抗原性物質は、背景抗原である。代表的な背景抗原は、粗精製状態の標的抗原に混在する蛋白質である。より具体的には、組み換え蛋白質に含まれる宿主に由来する蛋白質を、背景抗原として示すことができる。背景抗原とは、目的とする抗体産生を誘導するための免疫原に含まれ、目的としない抗体の産生を誘導する原因となる抗原と定義することもできる。背景抗原は、一般には標的抗原とは別物質の抗原性物質を指すものと考えられるが、本発明ではこれに限定されず標的抗原と同じ分子上に存在する抗原決定基を背景抗原に含めることができる。例えば、標的抗原と同じ分子上に抗体の産生を希望しない抗原決定基がある場合、該抗原決定基は本発明における背景抗原に含まれる。

[0010] 「免疫寛容(immunotolerance)」とは、免疫寛容の対象となる抗原(寛容原; immunotolerance antigens)に対して特異的に免疫応答が失われるか、または低下することを言う。正常な免疫動物の寛容原に対する免疫応答に対して、ある個体の同じ寛容原に対する免疫応答が低下しているとき、この個体は寛容原に対する免疫寛容を有すると言う。たとえば寛容原を投与した場合に産生される寛容原に対する抗体の量が減少していれば、免疫応答が低下していると見なすことができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1-a]実施例で用いた可溶型gp64遺伝子の塩基配列を示す図である。1から720塩基を示す。

[図1-b]実施例で用いた可溶型gp64遺伝子の塩基配列を示す図である。721から1486塩基を示す。

[図2]pCAG-sgp64ベクターの模式的な地図を示す図である。

[図3]Anti-Mouse IgGを用いたウエスタンブロット解析により、sgp64Tgmにおいてgp64

に対する免疫寛容が誘導されていることを確認した結果を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

- [0012] 本発明は、標的抗原以外に背景抗原として膜タンパク質が混在している免疫原を用いて、標的抗原に対する抗体を作製する場合に有益なトランスジェニック動物を提供するとともに、このトランスジェニック動物を用いた抗体作製方法及びシステムを提供する。
- [0013] 本発明では、上述した通り、背景抗原は膜蛋白質である。背景抗原として膜蛋白質が混在する場合としては、例えば、標的抗原を調製に用いた宿主生物由来の膜蛋白質が混在する場合や、発現系に使用されたウイルス由来の膜蛋白質が混在する場合などが挙げられる。たとえば、バキュロウイルス発現系を用いて標的抗原として膜蛋白質を調製する場合のように、標的抗原がウイルスベクター由来の膜蛋白質とともに発現される場合には、背景抗原として膜蛋白質が多量に混在する。
- [0014] ここで、「膜蛋白質」とは、通常、生体膜を構成している蛋白質を意味し、例えば、生体膜の内部に埋もれている蛋白質を意味するが、本発明においてはGPIアンカー型蛋白質などのようにアンカーなどを介して細胞膜面につながれている蛋白質も含まれる。また、ウイルス由来の膜蛋白質は、通常、出芽ウイルスの外披を構成する蛋白質を言う。一例として、バキュロウイルスであれば、gp64と呼ばれる蛋白質が膜蛋白質に相当する。このような膜蛋白質の構造の多くは、細胞膜内に埋もれた領域(細胞膜貫通領域)、細胞膜の外に露出している領域(細胞外領域)、細胞膜の内側に位置する領域(細胞内領域)を有する。また、膜蛋白質を機能的にみると、膜を構成する蛋白質、受容体、輸送体などのシグナル伝達等に関与する蛋白質や、膜酵素など特異的な反応を行うものなどが含まれる。そのため、こうした外来の膜蛋白質を免疫動物内に導入した場合、免疫動物のいずれかの生体膜等で発現して、免疫寛容を誘導するだけではなく、その他の好ましくない特性を付与することがある。その例として、バキュロウイルス由来の膜蛋白質gp64が導入されたマウスでは、雄の不妊という問題が生じる。
- [0015] 本発明の抗体作製システムの非ヒト動物では、上記背景抗原として免疫原中に混在し得るウイルス由来の膜蛋白質に対して免疫寛容が誘導される。例えば、バキュロ

ウイルス発現系を用いて調製した免疫原を用いる場合には、バキュロウイルス由来膜蛋白質gp64に対して免疫寛容が誘導された非ヒト動物が免疫動物として使用される。免疫寛容の誘導方法として、従来では、背景抗原である膜蛋白質全長をコードする遺伝子を免疫動物に保持させる方法が開発されていたが、本発明では、可溶化された膜蛋白質(以下「可溶型蛋白質」)をコードする遺伝子を非ヒト動物に保持させる。

[0016] 「可溶型蛋白質」とは、本来、生体膜上で発現している膜蛋白質(不溶性蛋白質)を生体膜外で発現し得るように改変した蛋白質を指す。上述した通り、膜タンパク質には、シグナル伝達に関与し得るような受容体や輸送体、膜酵素などの生体内のスイッチのような機能を担うものが存在するため、こうした膜蛋白質が免疫動物の生体膜で発現した場合に免疫動物に背景抗原に対する免疫寛容を誘導する以外に好ましくない特性を付与し得る。このような不都合を回避すべく、本発明では、膜蛋白質を生体膜外で発現させ得るように可溶型としている。また、膜蛋白質全長を用い生体膜という局在した部位で発現させる従来の方法に比して、本発明では膜蛋白質を可溶型として全身的な細胞質で発現可能となるため、より免疫寛容の誘導効率を高めることが期待できる。

[0017] 膜蛋白質を可溶型とする改変として、本発明では遺伝子工学的に膜蛋白質をコードする遺伝子を改変する方法が用いられる。遺伝子工学的な膜蛋白質の可溶化方法として、膜貫通領域を欠損させることが挙げられる。膜貫通領域の欠損の程度は、膜蛋白質を細胞外で発現させ得る限り、膜貫通領域の一部の欠損であってもよく、膜貫通領域全体の欠損であってもよい。膜貫通領域は、一般に20-30アミノ酸よりなる α ヘリックス構造をとるため、こうした構造に変化を与えるような変異を加えることにより、可溶型としてもよい。

[0018] また、膜蛋白質を可溶型蛋白質に改変する場合、膜貫通領域以外の領域として細胞内領域と細胞外領域とがあるが細胞内領域は備えている必要はなく、免疫寛容を誘導し得る抗原決定基を備えた細胞外領域のみに限定してもよい。さらに細胞外領域としても免疫寛容を誘導し得る範囲、例えば、抗原性を保持し、膜蛋白質に対する免疫寛容を誘導し得る抗原決定基を備えた範囲に限定することもできる。

- [0019] 上記可溶型蛋白質は、膜蛋白質等から膜貫通領域などを欠損させる以外に、他のペプチドなど付加または挿入したキメラ蛋白質から構成してもよい。キメラ蛋白質に付加・挿入するペプチドとして、他の背景抗原(この「他の背景抗原」は、膜蛋白質であるか否かを問わない)の抗原決定基とすることもできる。このように一つの蛋白質に複数の背景抗原に対する抗原決定基を備えることにより、複数の背景抗原に対する免疫寛容を誘導することもできる。
- [0020] 可溶型蛋白質の構築例として、バキュロウイルス膜蛋白質gp64の場合を例に挙げ説明する。gp64は配列番号1記載のDNA配列にコードされ、このうち膜貫通領域は1465塩基から1515塩基に、細胞外領域は1塩基から1464塩基にコードされている。したがって、gp64を可溶型とするには、上記膜貫通領域を欠失させるかまたは α ヘリックス構造を担うアミノ酸をコードする配列を他のアミノ酸に置換させることなどが挙げられる。また、上記細胞外領域については配列番号3に示す1塩基から1464塩基にコードされた488アミノ酸残基からなるタンパク質全体を用いてもよいが、細胞外領域のうちgp64とのクロスリアクティビティを維持しgp64の免疫寛容を誘導し得る範囲でその長さを短縮してもよい。また、後述する免疫動物においてgp64に対する免疫寛容を誘導し得る範囲で、gp64の細胞外領域のアミノ酸配列(配列番号1から3に記載の1から488アミノ酸残基)において一つまたはそれ以上のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入などの変異を加えてもよい。
- [0021] 本発明では、こうした可溶型蛋白質をコードした遺伝子を非ヒト動物に保持させ、免疫寛容を誘導している。本発明に用いることができる非ヒト動物としては、例えば、サル、ブタ、イヌ、ラット、マウス、ウサギ、などを挙げることができる。たとえば、ラット、マウス、ハムスターなどのげっ歯類は、好ましい非ヒト動物である。トランスジェニック動物とすることで免疫寛容を誘導するには、げっ歯類のような、成熟が早く、遺伝子操作の手法が確立されている非ヒト動物が有利である。特にマウスは、これらの条件を高い水準で満たすことができる非ヒト動物である。
- [0022] 上記可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持する非ヒト動物は、外来遺伝子として可溶型蛋白質をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニック動物を作製することにより得ることができる。例えば、トランスジェニックマウスは公知の方法に従って作

製することができる(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384(1980))。具体的には、目的の遺伝子を哺乳動物の全能細胞に導入し、この細胞を個体へと発生させる。得られた個体のうち、体細胞および生殖細胞中に導入遺伝子が組み込まれた個体を選別することによって、目的とするトランスジェニックマウスを作製することができる。遺伝子を導入する全能細胞としては、受精卵や初期胚のほか、多分化能を有するES細胞のような培養細胞などが挙げられる。より具体的には、後述する実施例記載の方法により作製できる。

[0023] また、本発明の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持する非ヒト動物は、上記トランスジェニック動物の子孫であってもよい。トランスジェニック動物が一旦樹立されれば、通常、導入された遺伝子による形質(本発明では免疫寛容の形質)を子孫に伝えることは容易である。しかし、従来開発されているバキュロウイルスgp64が導入されたトランスジェニック動物では雄の不妊の問題が生じ、その免疫寛容の形質を効率よく子孫に反映させることが困難であった。一方、本発明では、膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を用いてトランスジェニック動物を作製することにより、膜タンパク質全長をコードした遺伝子が導入されたトランスジェニック動物における好ましくない特性の発現が回避された。その一例として、バキュロウイルスgp64の可溶型蛋白質をコードする遺伝子を用いてトランスジェニック動物を作製することにより、雄の繁殖能が維持され、効率的な繁殖により形質を子孫に伝えることが容易になっている。可溶型gp64を保持したトランスジェニック動物は効率良く繁殖することができ、その子孫も免疫寛容の形質を保持しているため、後述する抗体作製等の免疫動物として有用となる。このように膜蛋白質全長ではなく、可溶型蛋白質をコードした遺伝子を非ヒト動物に保持させることにより、当該膜蛋白質に対する免疫寛容が誘導された免疫動物をより広く利用しやすいものとすることができる。

[0024] 本発明の膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物は、標的抗原蛋白を欠失させた遺伝子欠損動物(いわゆるノックアウト動物)を基に作製してもよい。また、蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物は背景抗原発現トランスジェニック動物をこうした標的抗原蛋白ノックアウト動物と交配してもよい。これらにより、背景抗原発現および標的抗原蛋白質欠損という形質を

非ヒト動物に備えさせることもできる。このように両形質を保持した動物では、背景抗原に対しては免疫寛容が誘導され、一方、標的抗原は先天的に保有していないため、標的抗原をより異物として認識され易く、目的の抗体を効率よく得ることができる。

[0025] なお、本発明の背景抗原に対して免疫寛容が誘導された非ヒト動物において、免疫原に含まれる可能性のある全ての背景抗原に対して、抗体の産生が抑制されることは必ずしも重要ではない。標的抗原に対する抗体の産生と取得が妨げられない範囲であれば、背景抗原を認識する抗体の産生は許容される。したがって、たとえば、主要な背景抗原に対してのみ免疫寛容が誘導された免疫動物であっても、本発明の好ましい免疫動物として利用することができる。

[0026] 本発明は上記膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物を利用した抗体作製方法に関する。

上記膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物に標的抗原以外に背景抗原として当該膜蛋白質を含む免疫原を免疫する工程と、前記標的抗原に対する抗体または抗体をコードした遺伝子を取得する工程とが含まれる。

[0027] 本発明における免疫原には、標的抗原以外に背景抗原として少なくとも膜蛋白質が含まれる。一般に、標的抗原は生物材料に由来する物質からなる。生物材料は、様々な成分を含む複雑な混合物である。したがって、標的抗原は、通常、多様な混合物を原料として調製されている。その結果、標的抗原を高度に精製することは困難である。言い換えれば、標的抗原を大量に、かつ高度に精製するには、多くの手間と時間を要する。本発明では、このような標的抗原以外に背景抗原として膜蛋白質が混在する免疫原を用いて、効率よく標的抗原に対する抗体を取得し得る方法が提供される。

[0028] 具体的には、本発明の免疫原として、背景抗原として膜蛋白質が混在し得る細胞、細胞培養液、細胞溶解物、ウイルス、あるいは未精製の抗原などを挙げることができる。細胞やウイルスを用いる場合には、目的の抗原をコードする遺伝子を遺伝子組み換え技術により細胞やウイルスに導入して、目的の抗原を人為的に発現させたものを用いることができる。細胞やウイルスなどは、その全体のみならず、その一部分のみを免疫原として用いることもできる。また、細胞膜やウイルスエンベロープ部分のみ

を免疫原として用いることも可能である。こうした細胞やウイルス全体、その一部として細胞膜やウイルスエンベロープを免疫原として用いた場合、細胞膜やウイルスエンベロープに含まれる膜蛋白質が背景抗原として混在する。

[0029] 本発明における望ましい免疫原の一つに、ウイルス粒子、またはその一部を示すことができる。ウイルスは、核酸と限られた蛋白質や糖等の比較的単純な成分で構成されている。したがって、標的抗原の取得を妨害する背景抗原の種類も限られる。ウイルス粒子、その一部中の標的抗原の取得を妨害する背景抗原として、粒子表面の膜蛋白質が挙げられる。粒子表面は免疫動物に投与された場合には、抗原性が高く、抗体産生を誘導し易い。従って、この少ない背景抗原の中でも、粒子表面などの膜蛋白質である背景抗原に対して免疫動物に免疫寛容を誘導すれば、本発明に基づく抗体の作製方法をより有利に実施することができる。

[0030] 本発明において、免疫原として用いることができるウイルスの中で、好適なものの一つにバキュロウイルス(Baculovirus)がある。バキュロウイルスは、2本鎖DNAからなるゲノムがキャプシド蛋白質に覆われた構造を有する昆虫ウイルスである。中でもバキュロウイルスの一種である核多角体病ウイルス(NPV)を利用した発現系は、外来性遺伝子の発現システムとして有用である。NPVは強力なプロモーター活性を有している。したがって、NPVのゲノムに外来性の遺伝子を組み込むことで、任意の蛋白質を大量に生産させることができる。具体的には、ポリヘドリンと呼ばれる蛋白質をコードする遺伝子を、任意の遺伝子に組み換えることによって、外来性の遺伝子の強力な発現が誘導される。

[0031] 上記バキュロウイルス発現系で発現させ得る外来性遺伝子には、特に限定はなく任意の遺伝子が用いられるが、バキュロウイルスは膜蛋白質を発現させるための好適な系として利用し得ることから、好適な遺伝子の例としては膜蛋白質をコードする遺伝子が挙げられる。バキュロウイルス発現系では、バキュロウイルスの膜蛋白質とともに目的の膜蛋白質を、その構造を維持した状態で発現させることができる。また、発現生成物を出芽ウイルスとして容易に回収できることも、バキュロウイルス発現系の利点である。

[0032] バキュロウイルスを用いて標的抗原である膜蛋白質を発現させる方法としては、例

えば、WO98/46777及びLoiselら(T.P.Loisel et al., Nature Biotech. 15: 1300-1304 (1997))に記載の出芽バキュロウイルスを用いた方法が挙げられる。より詳細には、外来性蛋白質をコードする遺伝子を含む昆虫細胞用の組換えベクターを作製し、バキュロウイルスDNAと共にSf9等の昆虫細胞へ導入する。組換えベクターにコードされた外来性の膜蛋白質は、感染細胞が死滅する前に感染細胞より細胞外に放出される成熟ウイルス粒子(ビリオン)上に発現され、外来性蛋白質を発現する組換えウイルスを得ることができる。

[0033] 本発明において、出芽ウイルスとは出芽(budding)により感染細胞から放出されるウイルスのことである。一般に細胞膜を被ったウイルスは細胞が破壊されていない状態でも当該ウイルスに感染した細胞から発芽し、継続的に放出されるのに対し、膜を被らないアデノウイルスや、核膜を被ったヘルペスウイルスは細胞が破壊された時に一斉に放出される。本発明においては、特に出芽ウイルスが好ましい。また、本発明において組換えウイルスを感染させる宿主は、当業者であれば、用いるウイルスの種類に応じて、ウイルスの増殖を可能ならしめる宿主を適宜選択することができる。例えば、バキュロウイルスを用いる場合、Sf9等の昆虫細胞の使用が考えられる。一般に、バキュロウイルス-昆虫細胞を用いたタンパク質発現系は、哺乳動物細胞と同様に脂肪酸アセチル化及び糖鎖付加等の翻訳と同時または翻訳後の修飾が行われること、並びに、哺乳動物細胞系よりも異種タンパク質の発現レベルが高いこと(Luckow V.A. and Summers M.D., Virol. 167: 56 (1988))から有利な系であると考えられている。

[0034] 標的抗原である外来性蛋白質を発現しているウイルスは、例えば、外来性蛋白質をコードする遺伝子を含む組換えウイルスを感染させた宿主を培養することによって得ることができる。または、上述のWO98/46777及びLoiselら(T.P.Loisel et al., Nature Biotech. 15: 1300-1304 (1997))の方法の様に、外来性蛋白質をコードする組換えベクターをバキュロウイルスと共に昆虫細胞に導入することにより、細胞外へ放出されるバキュロウイルスの膜上に外来性蛋白質を発現させることもできる。また、Strehlowら(D.Strehlow et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 97: 4209-4214(2000))の方法のように、外来性蛋白質をコードする遺伝子を導入したMoloneyウイルス由来ベクターより作製した組換えウイルスをPA317等のパッケージング細胞に感染させることにより、細胞外

へ放出されるMoloney murine leukemiaウイルスの膜上に外来性蛋白質を発現させることができる。これらは外来性蛋白質を発現させるウイルスの一例であり、本発明の免疫原に用いることができる外来性蛋白質を発現しているウイルスは、これらの方法により調製されたものに限定されない。

[0035] 上述のようにして調製された組換えウイルスは、必要に応じて公知の手法により精製することができる。例えば、増加密度勾配遠心法(augment density gradient centrifugation)(Albrechtsen et al., J.Virological Methods 28: 245-256 (1990); Hewish et al., J.Virological Methods 7: 223-228 (1983))、サイズ排除(size exclusion)クロマトグラフィー(Hjorth and Mereno-Lopez, J.Virological Methods 5: 151-158 (1982); Crooks et al., J.Chrom. 502: 59-68 (1990); Mento S.J. (Viagene, Inc.) 1994 Williamsburg Bioprocessing Conference)、モノクローナル抗体及びフコース硫酸含有多糖類等を利用したアフィニティークロマトグラフィー(Najayou et al., J.Virological Methods 32: 67-77 (1991); Diaco et al., J.Gen.Virol. 67: 345-351 (1986); Fowler, J.Virological Methods 11: 59-74 (1986); 特再表97/032010)、DEAEイオン交換クロマトグラフィー(Haruna et al., Virology 13: 264-267 (1961))等がウイルスを精製する方法として知られている。したがって、上述の方法、または、これらの方法を組み合わせて精製しても良い。

[0036] 上記のように調製された免疫原を用いて、免疫動物を免疫する。本発明で用いられる免疫動物は、免疫原中に含まれる背景抗原である膜蛋白質に対して免疫寛容が誘導された非ヒト動物が用いられる。背景抗原の膜蛋白質に対する免疫寛容の誘導は、上述した通り、当該膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を免疫動物に保持させることにより実施することができる。

[0037] 上記において膜蛋白質調製において好適な発現系として示したバキュロウイルス発現系を免疫原調製に用いた場合、免疫動物には、可溶型gp64をコードした遺伝子を保持させgp64に対して免疫寛容が誘導された非ヒト動物を用いることが好ましい。ここで免疫動物としてgp64全長をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物を用いることもできるが、雌雄共に繁殖能を有することから効率的に生産され広く利用可能な可溶型gp64トランスジェニック動物などを用いることが好ましい。従って、本発明の好適な

実施形態として、可溶型gp64をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物を免疫動物に用い、標的抗原として膜蛋白質を発現させた出芽バキュロウイルスを免疫原として免疫を行うことが挙げられる。

[0038] 本発明の抗体作製方法によれば、背景抗原として膜蛋白質の混在による標的抗原に対する抗体取得の妨害作用を抑制することができる。したがって、本発明を用いれば、バキュロウイルス発現系の外来性蛋白質の発現システムとしての利点を、免疫原の作製においても十分に生かすことが可能となる。

[0039] なお、免疫から抗体取得までの方法は公知の方法を用いることができる。免疫原による動物の免疫は、公知の方法にしたがって行われる。一般的方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射する。具体的には、免疫原をPBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したのに対し、所望により通常のアジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。アジュバントには、たとえばフロイント完全アジュバントが用いられる。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した免疫原を、4～21日毎に数回投与することが好ましい。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

[0040] 血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、免疫した動物の血液を採取し、血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してもよい。

[0041] 本発明の抗体作製方法にモノクローナル抗体作成方法を組み合わせてもよい。モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から抗体産生細胞を採取してクローニングする。抗体産生細胞としては、たとえば脾細胞を用いることができる。抗体産生細胞のクローニングには、細胞融合法を用いることができる。前記抗体産生細胞と融合される他方の親細胞としては、たとえば哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。より好ましくは、融合細胞(ハイブリドーマ)の選択マーカーとなる、特殊な栄養要求性や薬剤耐性を有するミエローマ細胞が挙げられる。前記抗体産生細胞とミエロー

マ細胞は、基本的には公知の方法に準じて細胞融合させることができる。細胞融合を利用したモノクローナル抗体の作製方法は、たとえばミルステインらによって確立されている(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)。

[0042] 細胞融合により得られたハイブリドーマは、選択培養液で培養することにより選択される。選択培養液は、細胞融合に用いたミエローマ細胞の特性などに応じて選択される。選択培養液としては、たとえば、HAT培養液(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液)が用いられる。ハイブリドーマは、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(非融合細胞)が死滅するのに十分な時間、当該HAT培養液で培養される。通常、数日～数週間培養を継続することにより、ハイブリドーマを選択することができる。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。

[0043] 次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスの腹水としてモノクローナル抗体を回収することができる。腹水からモノクローナル抗体を精製することもできる。モノクローナル抗体の精製には、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、目的の抗原をカップリングしたアフィニティークラムなどを利用することができる。

[0044] このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体とすることができる(例えば、Borrebæck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照)。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ、または抗体を産生する感作リンパ球等の抗体産生細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。

[0045] さらに、本発明の抗体作成方法に抗体の改変および修飾の技術を組み合わせて、抗体断片、抗体修飾物を得ることもできる。たとえば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv又は重鎖と軽鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) などである。抗体修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合し

た抗体を使用することもできる。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

- [0046] 発明の抗体作成方法にヒト抗体への改変技術を組み合わせることもできる。ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物(国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照)を基に背景抗原の可溶型蛋白質をコードする遺伝子を導入し、ヒト抗体作製能および背景抗原に対する免疫寛容能を保持させて、目的の抗原で免疫することで目的のヒト抗体を取得してもよい。
- [0047] また、本発明の方法により得られた抗体は、免疫動物に由来する非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体とすることができる。また免疫動物に由来する非ヒト抗体のCDR(相補性決定領域)とヒト抗体由来のFR(フレームワーク領域)および定常領域からなるヒト化抗体とすることもできる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。具体的には、たとえばキメラ抗体は、免疫動物の抗体の重鎖、および軽鎖の可変領域と、ヒト抗体の重鎖および軽鎖の定常領域からなる抗体である。免疫動物由来の抗体の可変領域をコードするDNAを、ヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることによって、キメラ抗体を得ることができる。
- [0048] ヒト化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称される改変抗体である。ヒト化抗体は、免疫動物由来の抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)を、ヒト抗体の相補性決定領域へ移植することによって構築される。その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。
- [0049] 具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(framework region; FR)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることによりヒト化抗体を得られる(欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照)。CDRを介して連結され

るヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

- [0050] 更に、免疫動物の抗体産生細胞から、抗体をコードする遺伝子を取得することができる。抗体をコードする遺伝子を取得する方法は、制限されない。たとえば、可変領域やCDRをコードする遺伝子を鋳型として、PCR法によって当該遺伝子を増幅することによって抗体をコードする遺伝子を得ることができる。抗体遺伝子をPCR法によって増幅するためのプライマーが公知である。得られた遺伝子を適当な発現系を用いて発現させることによって、目的とする抗体を製造することができる。あるいは、本発明によって得られた遺伝子を、種々の改変抗体(ヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体、免疫動物由来の抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)をヒト抗体の相補性決定領域に移植されたヒト化抗体)を製造するために利用することもできる。

本発明により、膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物を含む抗体作製システムが提供される。

- [0051] ウイルスの発現ベクターなどを用いて免疫原を調製した場合、そのウイルス由来あるいはウイルス発現ベクターが導入された宿主細胞由来の膜蛋白質が背景抗原として混在する場合がある。この背景抗原である膜蛋白質は、標的抗原である外来性遺伝子によるものではなく、ベクターや宿主などの発現系に由来する場合はほとんどである。そのため、発現系毎に混在し得る背景抗原の膜蛋白質を同定する。そして、その膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子をトランスジェニック技術により非ヒト動物に導入し、得られたトランスジェニック動物において膜蛋白質に対する免疫寛容を誘導されているかを確認する。非ヒト動物において免疫寛容が誘導されているか否かは、実施例に示したように、血清中に背景抗原である膜蛋白質に対する抗体が生成されているか否かを確認することにより行うことができる。

- [0052] 上記背景抗原に対する免疫寛容の誘導が確認された非ヒト動物は、背景抗原の膜蛋白質が可溶型として発現されるため、バキュロウイルスgp64で観られたような雄に

おける繁殖能の欠損などの好ましくない表現系の出願が回避され、広く利用可能な免疫動物として提供し得る。そのため、本発明の膜蛋白質の可溶型をコードした遺伝子を保持する免疫動物と、当該膜蛋白質が背景抗原として産生される発現系とを組み合わせることにより、効率的な抗体作製を支援し得るシステムを構築することができる。

[0053] 例えば、上述において詳述したバキュロウイルス発現系であれば、可溶型gp64をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物と組み合わせることにより、バキュロウイルス発現系の利点を抗体作製に反映させることができる。より具体的には、バキュロウイルス発現系では、gp64とともに標的抗原として所望の蛋白質、特に、膜蛋白質をその立体構造を保持したまま発現させることができ、この発現産物は出芽ウイルスとして容易に回収することができる。この出芽ウイルスを免疫原とし、可溶型gp64をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物を免疫動物として免疫する。この可溶型gp64をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物では、gp64に対して免疫寛容が誘導されているため、免疫原である出芽ウイルス上にgp64が多量に発現されていても、このgp64に対する抗体産生は抑制された状態で、標的抗原である膜蛋白質に対する抗体を産生させることが可能となる。従って、可溶型gp64をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物を用いることにより、gp64が背景抗原としてバキュロウイルス上で存在している状態でも、標的抗原に対する有利に抗体産生を誘導することが可能となる。その結果、本システムにより得られる抗体は、標的抗原に対する純度の高い抗体を得ることが可能となる。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0054] [実施例1]sgp64トランスジェニックベクターの構築

gp64遺伝子(配列番号:1、全長;1539bp)の膜貫通領域(1465塩基から1539塩基)を欠損させ細胞外領域のみを持つ遺伝子断片(可溶型gp64;1464bp、配列番号:3)をPCRにて調製した。

[0055] 具体的には、gp64の5'末端配列と制限酵素EcoRI認識配列とKOZAK配列を結合

した5'プライマー(64F1:5'-GAATTCCACCATGGTAAGCGCTATTGTT-3'、配列番号:5)とgp64の膜貫通領域直前の配列にEcoRI認識配列を5'末端接続した3'プライマー(s64R1:5'-GAATTCTCATTATACATGACCAAACATGAACGA-3'、配列番号:6)(図1-a、図1-b)、およびテンプレートDNAとしてpCAG-gp64ベクターを用い、以下の条件でPCR(Polymerase Chain Reaction)法を行った。PCR反応溶液の組成は、10 x ExTaq buffer(TaKaRa) 5 μ L, ExTaq付属dNTPミクスチャー 4 μ L, プライマー64F1(10 μ mole/L) 1 μ L, プライマーs64R1(10 μ mole/L) 1 μ L, pCAG-gp64 (500 pg/ μ L) 1 μ L, ExTaq (5 units/ μ L, TaKaRa) 0.5 μ L, H₂O 37.5 μ Lとした。サイクル反応は、94°C で5分加熱した後、94°C 15秒、57°C 30秒および 72°C 30秒を25サイクル、その後、72°C 7分処理し、4°C保存とした。増幅バンドをpGEM-Teasy (Promega) にサブクローニング後、E.coli (DH5 α , TOYOBO)へトランスフォームした。T7プライマー(5'-TAATACGACTCACTATA-3'、配列番号:7)、およびSP6プライマー(5'-CATACGATTTAGGTGACACTATAG-3'、配列番号:8)を用いてコロニーPCRを行い、インサートが確認されたクローンの塩基配列をABI Prism377 DNA sequencerを用いて、BigDye Cycle Sequence kit (Applied Biosystems)とT7プライマー、あるいはSP6プライマーにより解析し、目的の遺伝子を含むクローンを確認した。このクローンからgp64を含む断片を制限酵素EcoRI処理により切り出し、制限酵素EcoRI処理したpCAGGSベクターに挿入し、E.coli (DH5 α)へトランスフォームした。gp64断片の挿入方向は、制限酵素XhoIおよび XbaI 処理により得られたバンドのサイズ(約2.1kb)で判断し、pCAG-sgp64ベクターを作製した(図2)。設計通りのクローンを250 mLのLB培地を用い37 °Cで一晩培養し、Endofree MAXI kit (QIAGEN)を用いて精製して、プラスミド(581.6 μ g)を得た。

[0056] [実施例2]sgp64Tgm樹立

Tgm作製に用いるインジェクション用DNAフラグメントの調製は、pCAG-sgp64ベクターを制限酵素SalIおよびPstIで処理した後、sgp64遺伝子を含む断片(約3.7kb)を切り出し、Gel Extraction Kit (QIAGEN)により回収し、この断片を3ng/ μ lになるようにPBS⁻で希釈することにより行った。DNAフラグメントを注入するマウス前核期胚の回収は、次のように行なった。すなわち、BALB/cA雌マウス(日本クレア)を過排卵処理(5

i.u.のeCG(セトロピン;帝国臓器)を腹腔内投与、さらに48時間後5 i.u.のhCG(プベローゲン;三共)を腹腔内投与した後、同系統の雄マウス(日本クレア)と交配した。翌朝、膣栓を確認した雌マウスの卵管を灌流することにより、前核期胚を回収した。DNAフラグメントの前核期胚への注入は、マイクロマニピュレーターを用いて行った(ジーンターゲットングの最新技術(洋土社)、190-207 2000)。翌日、2細胞期に発生していた胚を、偽妊娠1日目の受容雌の左右の卵管に、各10個前後(1匹あたり20個前後)を移植した。分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し里親に哺育させた。

[0057] 上記方法に基づいて、DNAフラグメントを497個のBALB/cAマウス前核期胚へ注入し、そのうちの2細胞期胚に発生した430個を偽妊娠受容雌の卵管に移植した。その結果、66例の産仔が得られた。ここで得られた産仔について導入された遺伝子の確認を以下の通り行った。

[0058] マウス尾を採取し、Lysis buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 0.1M NaCl, 20mM EDTA, 1%SDS, Proteinase K 1mg/mL:TaKaRa)で55℃ 一晚処理した後、核酸自動分離装置(KURABO, NA-1000P)を用いゲノムDNAを抽出し、サザンブロット法およびPCR法による導入遺伝子の確認を行った。サザンブロット法による導入遺伝子の確認は、抽出したゲノム DNA (15 μ g)を制限酵素EcoRIで処理し、アガロースゲルで泳動後、ナイロンメンブレン (Hybond N+:Amersham)へ アルカリブロット法によりトランスファーした。プローブには、制限酵素EcoRI処理したpCAG-sgp64ベクターのsgp64を含む約1.5kbの断片を用い、³²Pでラベルした後、トランスファーしたゲノムDNAとハイブリダイズさせることによりサザンブロットを行った。ハイブリダイゼーションは、5x SSPE, 50%ホルムアミド, 5x デンハルト, 0.5% SDSをハイブリダイゼーション溶液として用い、45℃にて一晚ハイブリダイズさせた。ナイロンメンブレンの洗浄条件は、0.1% SDS を含む2x SSCで 65℃ 30分間、さらに、0.1% SDSを含む 1x SSCで65℃ 30分間で行なった。その後BAS2000(FUJIX)にて、シグナルを検出した。

[0059] また、PCR法による導入遺伝子の確認は、センスプライマーに上記64F1を、アンチセンスプライマーには上記s64R1を用い、以下の条件で行なった。PCR反応溶液の組成は、ゲノムDNA(100ng/ μ L) 1 μ L, 10 x ExTaq buffer(TaKaRa) 5 μ L, ExTaq付属

dNTPミクスチャー 4 μ L, プライマー64F1(10 μ mole/L) 1 μ L, プライマーs64R1(10 μ mole/L) 1 μ L, ExTaq (5 units/ μ L, TaKaRa) 0.5 μ L, H₂O 37.5 μ Lとした。サイクル反応は、94°Cで5分後、94°C 15秒、57°C 30秒、72°C 30秒を35サイクル、72°Cで7分処理後、4°C保存とした。増幅された産物を電気泳動し、約1.5kbのバンドの有無により行った。

[0060] 上記方法により、66例の産仔のうち、3例がsgp64遺伝子が導入されたTgm(DNAフラグメントを注入して得られたTgmをFounderと以下記載)であることが確認された(表1)。この3匹のFounderは1匹が雄で2匹が雌であった。

[0061] [表1]

	生存卵数/注入卵数	移植数	着床数	産仔数(雌, 雄)	離乳数(雌, 雄)	Founder
1st	120/133	114	61	29 (15, 14)	28 (14, 14)	0
2nd	78/88	76	22	4 (2, 2)	4 (2, 2)	0
3rd	102/111	101	55	12 (7, 5)	11 (7, 4)	雌 1, 雄 1
4th	130/165	126	64	21 (11, 10)	15 (8, 7)	雌 1
Total	430/497	417	202	66 (35, 31)	58 (31, 27)	雌 2, 雄 1

[0062] 得られたfounderは8週齢になった時点で、BALB/cAマウスと交配させた。具体的には、上記3匹Founderの内、雄Founder(ライン番号41)と5例の雌との交配により26匹の産仔が得られ、これら産仔の内12匹がTgm(F1マウス)であった。残りの2匹の雌Founder(ライン番号36および51)からは、それぞれ16匹、15匹の産仔が得られ、Tgm(F1マウス、雌雄含む)はそれぞれ9匹、8匹であり、雄Tgmはそれぞれ4匹、1匹であった(表2)。

[0063] [表2]

ライン番号	性別	産次回数	産仔数	Tgm (F1) 数
36	雌	2	雌 7 雄 9	雌 5 雄 4
41	雄	5	雌 11 雄 15	雌 4 雄 8
51	雌	2	雌 8 雄 7	雌 7 雄 1

[0064] [実施例3] 雄Tgmの繁殖能

実施例2において得られた雄Tgm(F1マウス)の繁殖能を調べた。繁殖能は 雄sgp64Tgm(F1マウス)が8週齢になった時点で、BALB/cAマウスと交配させ、その産

仔の有無、数を確認することにより行った。

- [0065] 3ラインのFounderからそれぞれ得られた雄Tgm(F1マウス)(各一匹)と2例の雌との交配により、それぞれ9匹(雌5、雄4)、9匹(雌2、雄7)、10匹(雌6、雄4)の産仔が得られ、これらの内Tgmは、それぞれ9匹(雌5、雄4)、8匹(雌2、雄6)、5匹(雌4、雄1)であり(表3)、3ラインいずれの雄Tgmにおいても、正常な繁殖能を有していることが確認できた。

- [0066] sgp64雄Tgm(F1マウス)の繁殖成績

[表3]

ライン番号	産次回数	産仔数	Tgm 数
36	2	雌 5 雄 4	雌 5 雄 4
41	2	雌 2 雄 7	雌 2 雄 6
51	2	雌 6 雄 4	雌 4 雄 1

- [0067] [実施例4]ウエスタンブロット法によるgp64に対するトレランスの確認

sgp64Tgmに出芽バキュロウイルス(pepT1-AcMNPV(pepT1-BV))を以下の通り免疫し、gp64に対するトレランス誘導の有無を確認した。

免疫はフロイント完全アジュバント(Difco)と不完全アジュバント(Difco)を用いて常法に従ってエマルジョンを作製し、皮下投与する事により行った。初回免疫量は1mg/匹で、2回免疫量は0.5mg/匹で行った。また2回免疫は初回免疫から14日後に行った。初回免疫から17日後に眼窩採血を行い、血清を採取した。コントロールとして、非トランスジェニックマウスに対しても同様に免疫およびその後の血清採取を行った。

- [0068] Tgmにおけるgp64に対するトレランスを確認するために以下のウエスタンブロット解析を行った。

抗原に用いたpepT1-BVを、12%ゲルを用い1 μ g/レーンで還元条件下SDS-PAGEを行った。泳動後PVDF膜にエレクトロブロットした。この膜に、上記において採取した血清を1/1000希釈し、反応させた後、PBS-T (0.05% Tween20含有PBS)を用いて、室温で5分間の洗浄を3回行なった。洗浄後、1/1000希釈したBiotin-Anti-Mouse IgG(γ)(Zymed)とStreptavidin-Alkaline Phosphatase(Zymed)を反応させた。発色はアルカリホスファターゼ染色キット(ナカライ)を用いて行った。

- [0069] Anti-Mouse IgGによる染色では非トランスジェニックマウス(non-Tgm)では3匹とも強く染色されていた(図3)。一方、sgp64Tgmではgp64が、ほとんど染まらず、sgp64Tgmにおいて、gp64に対するトレランス誘導を確認することができた。

産業上の利用可能性

- [0070] 本発明により、従来のバキュロウイルスの膜蛋白質gp64遺伝子が導入されたトランスジェニック動物における雄の不妊という問題が解消された新たなトランスジェニック動物が提供された。これはgp64という膜蛋白質をコードする遺伝子のうち、膜貫通領域をコードする配列を欠損等させて可溶型gp64を発現(つまりgp64を細胞膜外に発現)させることにより、上記問題の解決を図ることができた。したがって、本発明のように、膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子が導入されたトランスジェニック動物では、膜蛋白質全長をコードした遺伝子が導入されたトランスジェニック動物における好ましくない表現型、例えば、雄不妊などの好ましくない特性の出現を回避することが可能となる。
- [0071] また、上記の通り、可溶型蛋白質をコードした遺伝子が導入されたトランスジェニック動物では、膜蛋白質の全長をコードした遺伝子が導入されたトランスジェニック動物と同様に、膜蛋白質に対する免疫寛容が誘導されることが確認されている。したがって、免疫原中に背景抗原として膜蛋白質が混在しているような場合には、当該膜蛋白質の膜貫通領域等を欠損させた可溶型蛋白質をコードする遺伝子を外来遺伝子として有するトランスジェニック動物を免疫動物として用いることが有利となる。つまり、当該免疫動物は背景抗原の膜蛋白質に対する免疫寛容が誘導され、目的の抗原に対する特異的な抗体が有利に産生される上に、膜蛋白質全長が導入されたトランスジェニック動物の好ましくない表現型の出現が回避されるため、抗体作成用のシステムとして一層利用し易いものとなる。
- [0072] また、本発明の動物を用いて作製された抗体は、背景抗原に対する抗体の混在がないか又は極めて少ないため、高純度の抗体として提供される。

請求の範囲

- [1] 膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物。
- [2] 可溶型蛋白質をコードした遺伝子が外来から導入されたトランスジェニック動物からなる、請求項1記載の非ヒト動物。
- [3] 可溶型蛋白質をコードした遺伝子が外来から導入されたトランスジェニック動物の子孫である、請求項2記載の非ヒト動物。
- [4] 膜蛋白質がウイルス由来である、請求項1～3のいずれかに記載の非ヒト動物。
- [5] ウイルスがバキュロウイルスである、請求項4に記載の非ヒト動物。
- [6] 膜蛋白質がgp64である、請求項5記載の非ヒト動物。
- [7] 可溶型蛋白質が膜貫通領域を欠損したgp64である、請求項6記載の非ヒト動物。
- [8] 可溶型蛋白質がgp64の細胞外領域からなる、請求項6記載の非ヒト動物。
- [9] 非ヒト動物がマウスである、請求項1～8のいずれかに記載の非ヒト動物。
- [10] 雄が繁殖能を有する、請求項6～9のいずれかに記載の非ヒト動物。
- [11] 請求項1～10のいずれかに記載の非ヒト動物を、標的抗原を含有する免疫原で免疫する工程、
前記標的抗原に対する抗体または抗体をコードした遺伝子を取得する工程を含む、抗体作製方法。
- [12] 免疫原がウイルス粒子またはその一部である、請求項11記載の抗体作製方法。
- [13] ウイルスがバキュロウイルスである、請求項12記載の抗体作製方法。
- [14] 標的抗原が膜蛋白質である、請求項11～13のいずれかに記載の抗体作製方法。
- [15] 請求項1～10記載の非ヒト動物を含む、抗体作製システム。

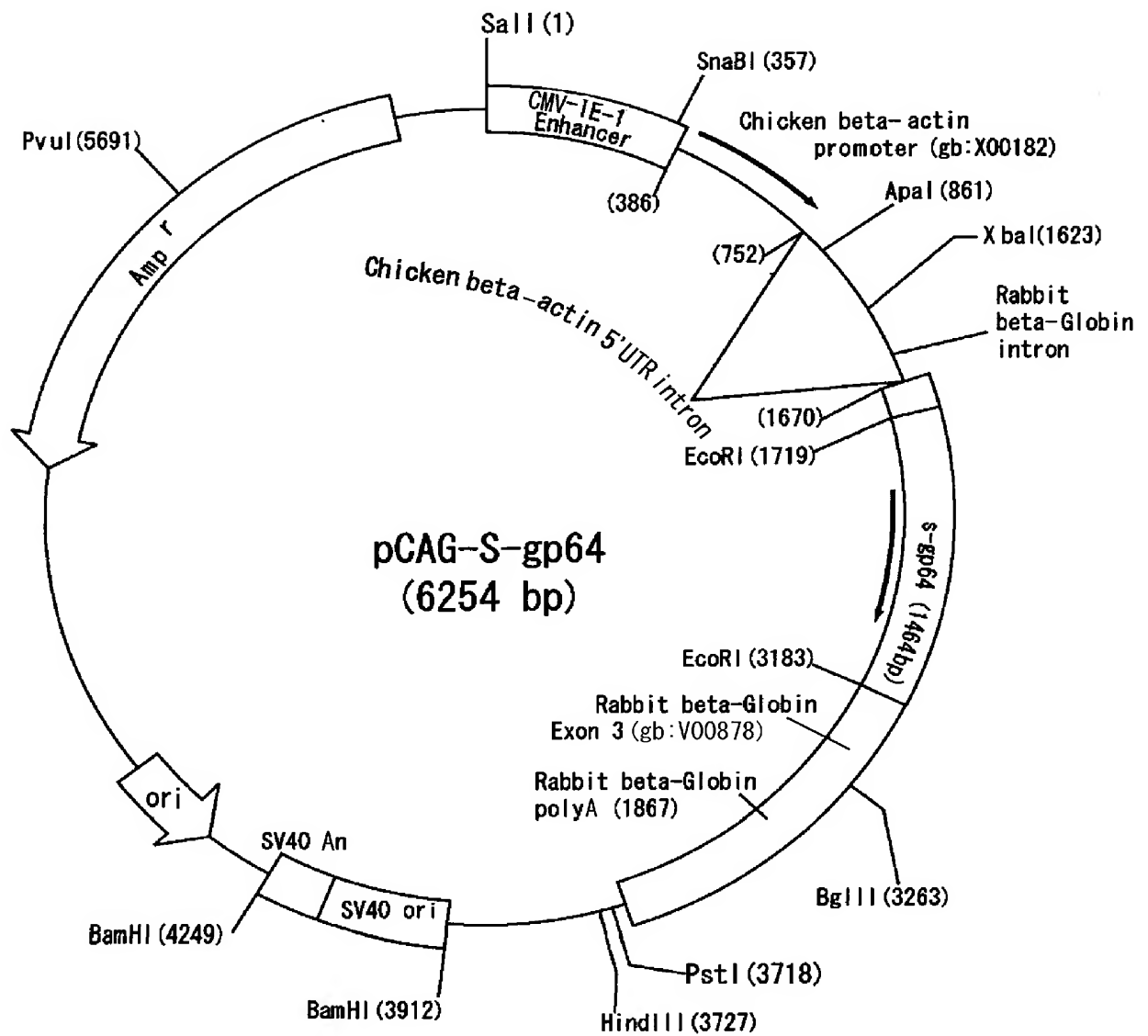
[☒1-a]

	10	20	30	40	50	60
p64	GAATTCCACC ATGGTAAGCG CTATTGTT TT ATATGTGCTT TTGGCGGCGG CGGCGCATTC N S T M V S A I V L Y V L L A A A A H S					
	70	80	90	100	110	120
p64	TGCCTTTGCG GCGGAGCACT GCAACGCGCA AATGAAGACG GGTCCGTACA AGATTAAAAA A F A A E H C N A Q M K T G P Y K I K N					
	130	140	150	160	170	180
p64	CTTGGACATT ACCCCGCCCA AGGAAACGCT GCAAAAGGAC GTGGAAATCA CCATCGTGGA L D I T P P K E T L Q K D V E I T I V E					
	190	200	210	220	230	240
p64	GACGGACTAC AACGAAAACG TGATTATCGG CTACAAGGGG TACTACCAGG CGTATGCGTA T D Y N E N V I I G Y K G Y Y Q A Y A Y					
	250	260	270	280	290	300
p64	CAACGGCGGC TCGCTGGATC CCAACACACG CGTCGAAGAA ACCATGAAAA CGCTGAATGT N G G S L D P N T R V E E T M K T L N V					
	310	320	330	340	350	360
p64	GGGCAAAGAG GATTTGCTTA TGTGGAGCAT CAGGCAGCAG TGCGAGGTGG GCGAAGAGCT G K E D L L M W S I R Q Q C E V G E E L					
	370	380	390	400	410	420
p64	GATCGACCGT TGGGGCAGTG ACAGCGACGA CTGTTTTCGC GACAACGAGG GCCGCGGCCA I D R W G S D S D D C F R D N E G R G Q					
	430	440	450	460	470	480
p64	GTGGGTCAAA GGCAAAGAGT TGGTGAAGCG GCAGAATAAC AATCACTTTG CGCACCACAC W V K G K E L V K R Q N N N H F A H H T					
	490	500	510	520	530	540
p64	GTGCAACAAA TCGTGGCGAT GCGGCATTTC CACTTCGAAA ATGTACAGCA GGCTCGAGTG C N K S W R C G I S T S K M Y S R L E C					
	550	560	570	580	590	600
p64	CCAGGACGAC ACGGACGAGT GCCAGGTATA CATTTTGGAC GCTGAGGGCA ACCCCATCAA Q D D T D E C Q V Y I L D A E G N P I N					
	610	620	630	640	650	660
p64	CGTGACCGTG GACACTGTGC TTCATCGAGA CGGCGTGAGT ATGATTCTCA AACAAAAGTC V T V D T V L H R D G V S M I L K Q K S					
	670	680	690	700	710	720
p64	TACGTTTACC ACGCGCCAAA TAAAAGCTGC GTGTCTGCTC ATTAAAGATG ACAAAAATAA T F T T R Q I K A A C L L I K D D K N N					

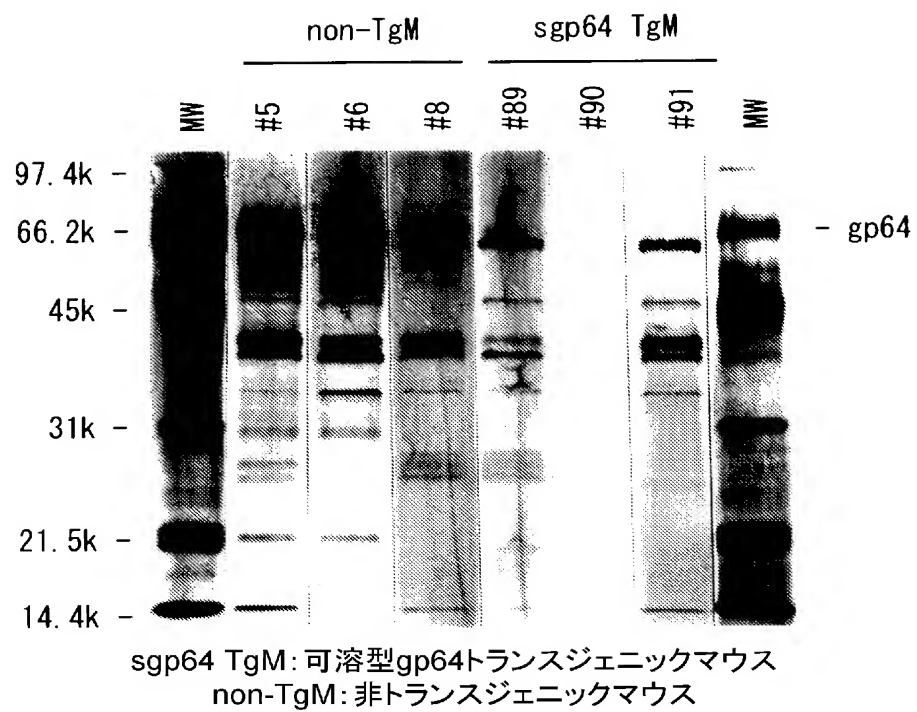
[☒]1-b]

p64	730 740 750 760 770 780 CCCCGAGTCG GTGACACGCG AACACTGTTT GATTGACAAT GATATATATG ATCTTCTAA P E S V T R E H C L I D N D I Y D L S K
p64	790 800 810 820 830 840 AAACACGTGG AACTGCAAGT TTAACAGATG CATTAAACGC AAAGTCGAGC ACCGAGTCAA N T W N C K F N R C I K R K V E H R V K
p64	850 860 870 880 890 900 GAAGCGGCCG CCCACTTGGC GCCACAACGT TAGAGCCAAG TACACAGAGG GAGACACTGC K R P P T W R H N V R A K Y T E G D T A
p64	910 920 930 940 950 960 CACCAAAGGC GACCTGATGC ATATTCAAGA GGAGCTGATG TACGAAAACG ATTTGCTGAA T K G D L M H I Q E E L M Y E N D L L K
p64	970 980 990 1000 1010 1020 AATGAACATT GAGCTGATGC ATGCGCACAT CAACAAGCTA AACAATATGC TGCACGACCT M N I E L M H A H I N K L N N M L H D L
p64	1030 1040 1050 1060 1070 1080 GATAGTCTCC GTGGCCAAGG TGGACGAGCG TTTGATTGGC AATCTCATGA ACAACTCTGT I V S V A K V D E R L I G N L M N N S V
p64	1090 1100 1110 1120 1130 1140 TTCTTCAACA TTTTGTCTGG ACGACACGTT TTTGCTGATG CCGTGCACCA ATCCGCCGGC S S T F L S D D T F L L M P C T N P P A
p64	1150 1160 1170 1180 1190 1200 ACACACCAGT AATTGCTACA ACAACAGCAT CTACAAAGAA GGGCGTTGGG TGGCCAACAC H T S N C Y N N S I Y K E G R W V A N T
p64	1210 1220 1230 1240 1250 1260 GGACTCGTCG CAATGCATAG ATTTTAGCAA CTACAAGGAA CTAGCAATTG ACGACGACGT D S S Q C I D F S N Y K E L A I D D D V
p64	1270 1280 1290 1300 1310 1320 CGAGTTTTGG ATCCCGACCA TCGGCAACAC GACCTATCAC GACAGTTGGA AAGATGCCAG E F W I P T I G N T T Y H D S W K D A S
p64	1330 1340 1350 1360 1370 1380 CGGCTGGTCG TTTATTGCCC AACAAAAAAG CAACCTCATA ACCACCATGG AGAACACCAA G W S F I A Q Q K S N L I T T M E N T K
p64	1390 1400 1410 1420 1430 1440 GTTTGGCGGC GTCGGCACCA GTCTGAGCGA CATCACTTCC ATGGCTGAAG GCGAATTGGC F G G V G T S L S D I T S M A E G E L A
p64	1450 1460 1470 1480 1490 1500 CGCTAAATTG ACTTCGTTCA TGTTTGGTCA TGTATAATGA GAATTC (SEQ ID NO:9) A K L T S F M F G H V * * E F (SEQ ID NO:10)

[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006298

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A01K67/027, C07K16/18, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A01K67/027, C07K16/18, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOTECHNOLOGY ABSTRACT(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), JSTPlus(JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	TAMURA Y., et al., CD14 transgenic mice expressing membrane and soluble forms: comparisons of levels of cytokines and lethality in response to lipopolysaccharide between transgenic and non-transgenic mice., Int.Immunol., (1999), Vol.11, No.3, p.333-9.	1-3,9-10/ 4-8,11-15
X/A	WATANABE, C. et al., Enhanced immune responses in transgenic mice expressing a truncated form of the lymphocyte semaphoring CD100, J.Immunol., (2001), Vol.167, No.8, p.4321-8.	1-2,9/ 3-8,10-15
Y	LU, W., et al., Characterization of a truncated soluble form of the abculovirus (AcMNPV) major envelope protein Gp64, Protein Expr.Purif., (2002), Vol.24, No.2, pages 196 to 201	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 June, 2005 (23.06.05)

Date of mailing of the international search report

12 July, 2005 (12.07.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006298

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HEFFERON, K.L., et al., Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry, Virology (1999), Vol.258, No.2, p.455-68	1-15
Y	Toshihiko OTOMO et al., "Gp64 Hatsugen/CCR2 Knockout Mouse Narabini COR2 Hatsugen Baculovirus o Mochiita Kinoteki Kotai no Sakusei", Nihon Bunshi Seibutsu Gakkai Nenkai Program Koen Yoshishu, (2003), Vol.26, page 660	1-15
Y	Norio KAMATA et al., "gp64 Hatsugen Mouse no Sakushutsu Narabini Hatsugagata Baculovirus ni Taisuru Tolerance Yudo", Nihon Bunshi Seibutsu Gakkai Nenkai Program Koen Yoshishu (2003), Vol.26, page659	1-15
Y	WO 2003/104453 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 December, 2003 (18.12.03), Full text & AU 2003242024 A1 & EP 1514928 A1	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006298

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to claims 1 to 15 resides in a nonhuman animal carrying a gene encoding a soluble protein of a membrane protein.

However, a transgenic mouse carrying a gene encoding a soluble protein of a membrane protein was known in public on the priority date of the present case (see, Int. Immunol (1999), Vol.11, No.3, p.333-9, J. Immunol (2001), Vol.167, No.8, p.4321-8, etc.). Thus, this technical feature does not make a contribution over prior art, considering the disclosures in the above documents, and, therefore cannot be considered as a special technical feature. Furthermore, there is no the same or corresponding special technical feature.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A01K67/027, C07K16/18, C12N15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A01K67/027, C07K16/18, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOTECHNOLOGY ABSTRACT (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS),
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	TAMURA, Y., et al., CD14 transgenic mice expressing membrane and soluble forms: comparisons of levels of cytokines and lethality in response to lipopolysaccharide between transgenic and non-transgenic mice, Int Immunol (1999) Vol. 11, No. 3, p. 333-9.	1-3, 9-10/ 4-8, 11-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23.06.2005

国際調査報告の発送日

12.7.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

左海 匡子

4 N

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	WATANABE, C., et al., Enhanced immune responses in transgenic mice expressing a truncated form of the lymphocyte semaphorin CD100, J Immunol (2001) Vol.167, No.8, p.4321-8.	1-2, 9/ 3-8, 10-15
Y	LU, W., et al., Characterization of a truncated soluble form of the baculovirus (AcMNPV) major envelope protein Gp64, Protein Expr Purif (2002) Vol.24, No.2, p.196-201.	1-15
Y	HEFFERON, K. L., et al., Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry, Virology (1999) Vol.258, No.2, p.455-68.	1-15
Y	大友俊彦ほか、Gp64 発現/CCR2 ノックアウトマウスならびに CCR2 発現バキュロウイルスを用いた機能的抗体の作製 日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 (2003) 第26 巻第660頁	1-15
Y	鎌田宣夫ほか、gp64 発現マウスの作出ならびに発芽型バキュロウイルスに対するトレランス誘導 日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 (2003) 第26 巻第659頁	1-15
Y	WO 2003/104453 A1 (中外製薬株式会社) 2003.12.18, 全文 & AU 2003242024 A1 & EP 1514928 A1	1-15

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲_____は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲_____は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲_____は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-15に共通の事項は、膜蛋白質の可溶性蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物である。

しかしながら、本願優先日当時、膜蛋白質の可溶性蛋白質をコードした遺伝子を保持したトランスジェニックマウスは公知であり（Int Immunol (1999) Vol. 11, No. 3, p. 333-9., J Immunol (2001) Vol. 167, No. 8, p. 4321-8 等参照）、当該技術的特徴は上記文献の開示内容に照らして先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、ほかに同一のまたは対応する特別な技術的特徴が存在しない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。